

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(43) Date of publication of application : **18.12.1998**

G02B 21/36
G02B 21/26

(71)Applicant : **NIKON CORP**

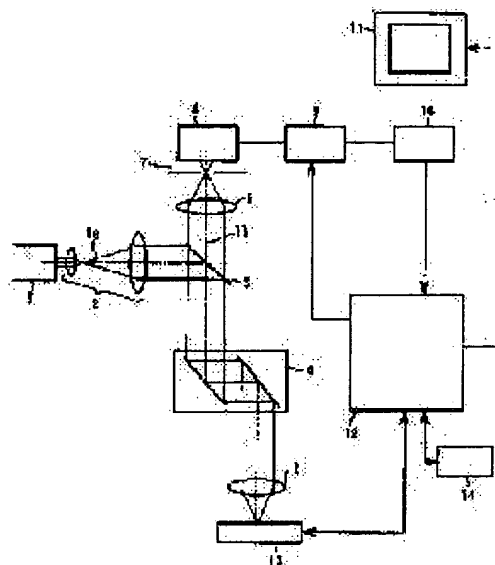
(72)Inventor : **OGINO KATSUMI**

(54) MICROSCOPIC DEVICE AND IMAGE FORMING METHOD

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a wide field image without sacrificing resolution by moving a stage based on stored moving position information so that plural partial images may be acquired and connecting the partial images by an image synthesizing means.

SOLUTION: An objective lens 5 condenses a laser beam 1a on a sample so as to irradiate the sample with the laser beam 1a. A detector 8 detects fluorescence 1b passing through a pinhole 7 and converts it into an electrical signal (analog signal). An A/D converter 9 converts the electrical signal from the detector 8 into a digital signal and outputs it by one frame. A frame memory 10 temporarily stores the partial images of one frame. A memory 14 stores the moving position information on a scanning stage 13. In such a case, the stage 13 is moved based on the obtained moving position information on the stage 13 by a CPU 12 so that four partial images may be acquired, and the four partial images are connected in specified order so as to obtain one image equivalent to an entire image obtained by scanning once.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-333056

(43) 公開日 平成10年(1998)12月18日

(51) Int.Cl.⁶

G 0 2 B 21/36

21/26

識別記号

F I

G 0 2 B 21/36

21/26

審査請求 未請求 請求項の数6 F D (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願平9-154597

(22) 出願日 平成9年(1997)5月28日

(71) 出願人 000004112

株式会社ニコン

東京都千代田区丸の内3丁目2番3号

(72) 発明者 荻野 克美

東京都千代田区丸の内3丁目2番3号 株

式会社ニコン内

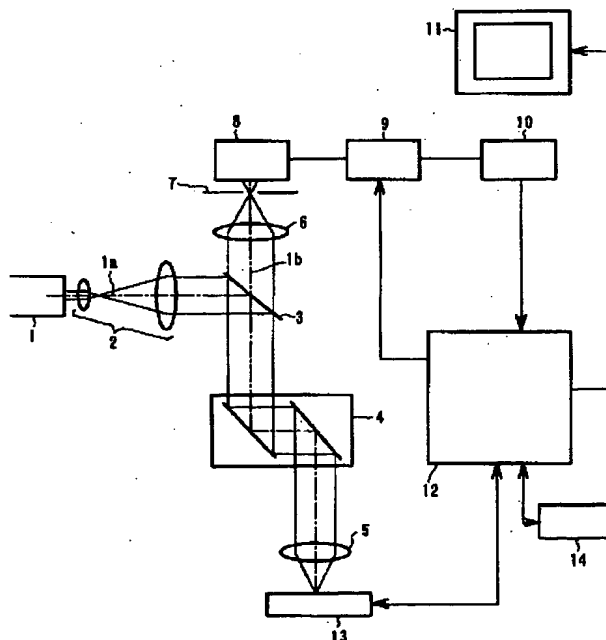
(74) 代理人 弁理士 木内 修

(54) 【発明の名称】 顕微鏡装置及び画像作成方法

(57) 【要約】

【課題】 広視野の画像を分解能を犠牲にすることなく得ることができ、しかも安価な顕微鏡装置及び画像作成方法を提供する。

【解決手段】 2次元的に移動可能な走査ステージ13上の試料の画像を作成する画像作成方法において、走査ステージ13の移動位置情報をメモリ14に記憶し、メモリ14に記憶された移動位置情報に基づいて走査ステージ13を移動させて複数の部分画像を取得し、複数の部分画像を1つの画像につなぎ合わせる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 2次元的に移動可能なステージ上の試料の画像を取得・観察する顕微鏡装置において、前記ステージの移動位置情報を記憶する記憶手段と、前記記憶手段に記憶された移動位置情報に基づいて前記ステージを移動させて複数の部分画像を取得する画像取得手段と、

前記複数の部分画像を1つの画像につなぎ合わせる画像合成手段とを備えていることを特徴とする顕微鏡装置。

【請求項2】 キャリブレーションチャートを用いて複数の部分画像を取得し、それらの部分画像を1つの画像につなぎ合わせたときに得られた前記ステージの移動距離が、前記移動位置情報であることを特徴とする請求項1に記載の顕微鏡装置。

【請求項3】 前記記憶手段に記憶される前記移動位置情報は、前記画像合成手段による前記複数の部分画像のつなぎ合わせに適したX方向移動位置情報とY方向移動位置情報とであることを特徴とする請求項1又は2に記載の顕微鏡装置。

【請求項4】 2次元的に移動可能なステージ上の試料の画像を作成する画像作成方法において、前記ステージの移動位置情報を記憶手段に記憶させる第1工程と、

前記記憶手段に記憶された移動位置情報に基づいて前記ステージを移動させて複数の部分画像を取得する第2工程と、

前記複数の部分画像を1つの画像につなぎ合わせる第3工程とを含むことを特徴とする画像作成方法。

【請求項5】 キャリブレーションチャートを用いて複数の部分画像を取得し、それらの部分画像を1つの画像につなぎ合わせたときに得られた前記ステージの移動距離が、前記移動位置情報であることを特徴とする請求項4に記載の画像作成方法。

【請求項6】 前記記憶手段に記憶される情報は、前記画像合成手段による前記複数の部分画像のつなぎ合わせに適したX方向移動位置情報とY方向移動位置情報とであることを特徴とする請求項4又は5に記載の画像作成方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】この発明は顕微鏡装置及び画像作成方法に関する。

【0002】

【従来の技術】レーザ走査顕微鏡は、レーザ光を射出するレーザ光源と、このレーザ光を対物レンズの瞳面を満たす大きさに拡大するビームエキスパンダと、試料で励起された蛍光を透過させるビームスプリッタと、レーザ光を2次元走査するXYスキャナと、XYスキャナと試料との間に配置された対物レンズと、対物レンズの焦点面と共役な位置に蛍光を集光させる集光レンズと、対物

レンズの焦点面と共役な位置に設けられたピンホールと、ピンホールを通過した蛍光を検出し、電気信号に変換する蛍光検出器と、蛍光検出器からの電気信号をA/D変換によってデジタル化するA/D変換器と、デジタル化した信号を1画面分記憶するフレームメモリと、演算等の処理を行うCPUと、CPUで処理された結果を画像化して表示するモニタとを備える。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】上記構成のレーザ走査顕微鏡では、フレームメモリの容量によって画像の分解能や視野の大きさが制限される。

【0004】対物レンズによって決定される光学分解能を損なわないように配慮すれば、定められた画素数の下では自動的に得られる視野の大きさが決定され、それは非常に狭いものとなる。

【0005】一方、観察したい視野が予め広く決まっている場合には、試料上でサンプリングする画素の間隔が大きくなって、対物レンズで得られるはずの光学分解能に追いつかない画像となる。

【0006】一般に、フレームメモリを大きくするだけでなく、XYスキャナの振れ角を大きくし、且つ対応する走査光学系に変更する必要がある。また、視野を大きくすれば、視野周辺での視野照明ムラ（シェーディング）等の問題が発生する。

【0007】図9（a）は対物レンズのもつ光学分解能を損なわない視野の場合の説明図、図9（b）は観察したい視野が予め決まっている場合の説明図、図9（c）は容量の大きなフレームメモリを用いた場合の説明図である。

【0008】例えば、100倍の対物レンズを用いたとき、接眼視野の径は $250\mu\text{m}$ となる。したがって、接眼視野に内接する正方形を視野とした場合、縦横約 $180\mu\text{m}$ の試料が表示される。

【0009】この視野を 512×512 のフレームメモリを用いて画像を取得すると、画素p間の間隔（ ΔX 、 ΔY ）は約 $0.35\mu\text{m}$ となる。

【0010】ところで、光学顕微鏡の分解能は対物レンズの開口数と使用する波長によって決まる。例えば $0.2\mu\text{m}$ の分解能を有する光学顕微鏡であれば、 $0.2\mu\text{m}$ 程度の細かいものが肉眼で見える。

【0011】したがって、上記視野を画像化した場合には、対物レンズによる分解能が追いつかず、もし画像領域内に光学分解能に匹敵する微細な構造が存在したとしても、モニタ111の画面上でその構造を画像化することはできない（図9（b）参照）。

【0012】対物レンズのもつ光学分解能を損なわないように画像を取得するには、対物レンズの分解能を $0.2\mu\text{m}$ としたとき、レーザ走査顕微鏡では画素間隔がこの分解能と同程度の間隔で走査する必要がある。具体的には、ナイキストのサンプリング定理から、対物レンズ

の分解能の半分 ($0.1\mu\text{m}$) で走査すれば元の画像を忠実に再現できることがわかっている。

【0013】すなわち、上記した接眼視野の場合には、元の画像を忠実に再現できる視野は縦横 $50\mu\text{m}$ の範囲となって元のモニタ111画面に対して非常に狭いものとなる(図9(a)参照)。

【0014】これに対し、図9(c)に示すように、例えば容量が 4096×4096 のフレームメモリを用い、XYスキャナの走査範囲を広くすることも考えられるが、上記フレームメモリは高価であるという問題がある。

【0015】この発明はこのような事情に鑑みてなされたもので、その課題は広視野の画像を分解能を犠牲にすることなく得ることができ、しかも安価な顕微鏡装置及び画像作成方法を提供することである。

【0016】

【課題を解決するための手段】前述の課題を解決するため請求項1記載の発明の顕微鏡装置は、2次元的に移動可能なステージ上の試料の画像を取得・観察する顕微鏡装置において、前記ステージの移動位置情報を記憶する記憶手段と、前記記憶手段に記憶された移動位置情報に基づいて前記ステージを移動させて複数の部分画像を取得する画像取得手段と、前記複数の部分画像を1つの画像につなぎ合わせる画像合成手段とを備えていることを特徴とする。

【0017】記憶手段にステージの移動位置情報を記憶させ、画像取得手段でこの移動位置情報に基づいてステージを移動させて複数の部分画像を取得し、画像合成手段で複数の部分画像をつなぎ合わせて1回の走査で得られた全体画像に匹敵する1枚の画像を得る。

【0018】請求項2記載の発明の顕微鏡装置は、請求項1に記載の顕微鏡装置において、キャリブレーションチャートを用いて複数の部分画像を取得し、それらの部分画像を1つの画像につなぎ合わせたときに得られた前記ステージの移動距離が、前記移動位置情報であることを特徴とする。

【0019】キャリブレーションチャートを用いて複数の部分画像を取得し、それらの部分画像を1つの画像につなぎ合わせたとき、1枚目の部分画像の座標から見た、他の部分画像の始点となる仮想の座標を、キャリブレーションチャートを用いてティーチングし、移動位置情報を取得する。

【0020】請求項3記載の発明の顕微鏡装置は、請求項1又は2に記載の顕微鏡装置において、前記記憶手段に記憶される情報は、前記画像合成手段による前記複数の部分画像のつなぎ合わせに適したX方向移動位置情報とY方向移動位置情報とであることを特徴とする。

【0021】1枚目の部分画像の座標から見た、他の部分画像の始点となる仮想の座標を、キャリブレーションチャートを用いてティーチングし、複数の部分画像のつ

なぎ合わせに適したステージのX方向移動位置情報とY方向移動位置情報を取得する。

【0022】請求項4記載の発明の画像作成方法は、2次元的に移動可能なステージ上の試料の画像を作成する画像作成方法において、前記ステージの移動位置情報を記憶手段に記憶させる第1工程と、前記記憶手段に記憶された移動位置情報に基づいて前記ステージを移動させて複数の部分画像を取得する第2工程と、前記複数の部分画像を1つの画像につなぎ合わせる第3工程とを含むことを特徴とする。

【0023】記憶手段に予め記憶されたステージの移動位置情報に基づいて走査ステージを移動させて複数の部分画像を取得し、この複数の部分画像をつなぎ合わせて1回の走査で得られた全体画像に匹敵する1枚の画像を得る。

【0024】請求項5記載の発明の画像作成方法は、請求項4に記載の画像作成方法において、キャリブレーションチャートを用いて複数の部分画像を取得し、それらの部分画像を1つの画像につなぎ合わせたときに得られた前記ステージの移動距離が、前記移動位置情報であることを特徴とする。

【0025】キャリブレーションチャートを用いて複数の部分画像を取得し、それらの部分画像を1つの画像につなぎ合わせたとき、1枚目の部分画像の座標から見た、他の部分画像の始点となる仮想の座標を、キャリブレーションチャートを用いてティーチングし、移動位置情報を取得する。

【0026】請求項6記載の発明の画像作成方法は、請求項4又は5に記載の画像作成方法において、前記記憶手段に記憶される情報は、前記画像合成手段による前記複数の部分画像のつなぎ合わせに適したX方向移動位置情報とY方向移動位置情報とであることを特徴とする。

【0027】1枚目の部分画像の座標から見た、他の部分画像の始点となる仮想の座標を、キャリブレーションチャートを用いてティーチングし、複数の部分画像のつなぎ合わせに適したステージのX方向移動位置情報とY方向移動位置情報を取得する。

【0028】

【発明の実施の形態】以下、この発明の実施の形態を図面に基づいて説明する。

【0029】図1はこの発明の一実施形態に係るレーザ走査顕微鏡装置の概念図である。

【0030】このレーザ走査顕微鏡装置は、レーザ光源1と、ビームエキスパンダ2と、ビームスプリッタ3と、スキャナユニット4と、対物レンズ5と、集光レンズ6と、ピンホール7と、検出器8と、A/D変換器9と、フレームメモリ(画像取得手段)10と、モニタ11と、CPU(画像合成手段)12と、走査ステージ(ステージ)13と、メモリ(記憶手段)14を備える。

【0031】ビームエキスパンダ2はレーザ光源1から出射されたレーザ光1aを対物レンズ5の瞳面を満たす大きさに拡大し、対物レンズ5の瞳面を洩れなく照明する。

【0032】ビームスプリッタ3はレーザ光1aを反射し、走査ステージ13上の試料(図示せず)で励起された蛍光1bを透過させる。このビームスプリッタ3はダイクロイックミラーを用いることもできる。

【0033】スキャナユニット4は走査ミラーを備え、レーザ光1aを2次元的(XY方向)に走査する。

【0034】対物レンズ5はレーザ光1aを試料に集光させ、レーザ光1aによって試料を照明する。

【0035】ピンホール7は対物レンズ5の焦点面と共役な位置に配置された集光レンズ6で集光された蛍光1bだけを通過させる。集光レンズ6は集めた蛍光1bを損失なくピンホール7へ進ませる。

【0036】検出器8はピンホール7を通過した蛍光1bを検出し、電気信号(アナログ信号)に変換する。

【0037】A/D変換器9は検出器8からの電気信号をA/D変換によって「1」と「0」の数値で表すことができるデジタル信号に変換し、1フレーム分ずつ出力する。

【0038】フレームメモリ10は1フレーム分の部分画像をいったん記憶する。このフレームメモリ10には、例えばDRAMを4個使用する。

【0039】モニタ11はCPU12で複数の部分画像を1つの画像につなぎ合わせる処理が行われた画像を表示する。

【0040】メモリ14は走査ステージ13の移動位置情報を記憶する。移動位置情報は後述するキャリブレーションチャート15Aを用いて複数の部分画像を取得し、それらの部分画像を1つの画像につなぎ合わせたときに得られた走査ステージ13の移動距離であり、X方向移動位置情報とY方向移動位置情報とからなる。なお、走査ステージ13は圧電素子(図示せず)によって駆動され、CPU12の指示に基づいて微小距離ずつ移動できる。

【0041】図2は画像作成方法を説明する図である。

【0042】図は部分画像の画素数を512×512とし、4枚の部分画像をつなぎ合わせて画素数が1024×1024の画像を作成する場合を示している。

【0043】CPU12は後述する第1工程で得た走査ステージ13の移動位置情報に基づいて走査ステージ13を移動させて4枚の部分画像A、B、C、Dを取得し(第2工程)、この4枚の部分画像A、B、C、Dを所定の順序でつなぎ合わせて1回の走査で得られた全体画像に匹敵する1枚の画像を得る(第3工程)。

【0044】部分画像A、B、C、Dのつなぎ合わせは次のように行われる。

【0045】1枚目の部分画像Aの画素の座標(以下、

単に座標と称する)(1, 512)の右方へ1画素離れた仮想の座標(1, 513)に、2枚目の部分画像Bの座標(1, 1)を一致させる。

【0046】1枚目の部分画像Aの座標(512, 1)の下方へ1画素離れた仮想の座標(513, 1)に、3枚目の部分画像Cの座標(1, 1)を一致させる。

【0047】1枚目の部分画像Aの座標(512, 512)の右及び下方へ1画素づつ離れた仮想の座標(513, 513)に、4枚目の部分画像Dの座標(1, 1)を一致させる。

【0048】上記作成方法によれば、得られた画像は広視野であるとともに、各部分画像A、B、C、Dと同等の光学分解能を維持する。

【0049】図3(a)はキャリブレーションチャートが形成されたスライドガラスの平面図であり、図3

(b)はチャートパターンが連続でない場合を説明するモニタ画面を示す図、図3(c)はチャートパターンが連続である場合を説明するモニタ画面を示す図である。

【0050】キャリブレーションチャート15Aはスライドガラス15の表面に昇目状(例えば、10×10μm)のチャートパターンとして形成されている。

【0051】1枚目の部分画像Aの座標(1, 1)から見た、他の部分画像B、C、Dの仮想の座標(1, 513)、(513, 1)及び(513, 513)は、キャリブレーションチャート15Aを用いてティーチングされる。

【0052】スライドガラス15を走査ステージ13上に配置し、レーザ光1aをXY方向に走査して部分画像Aを取得した後、走査ステージ13を部分画像の大きさに対応した距離づつX方向及びY方向へ移動して部分画像B、部分画像C及び部分画像Dを取得する。その結果、図3(b)に示す画像が得られる。

【0053】図3(b)からわかるように、上記走査ステージ13の移動だけでは各部分画像のチャートパターンは連続しないので、走査ステージ13を更にX方向及びY方向に移動させて微調整し、図3(c)に示すように各部分画像A、B、C、DのチャートパターンがX方向及びY方向で連続するようにする。

【0054】この微調整後の部分画像Aから部分画像B、部分画像C及び部分画像Dへのそれぞれの移動距離が、2枚目、3枚目、4枚目の部分画像B、C、Dを取り込むための移動位置情報としてメモリ14に記憶される(第1工程)。

【0055】このティーチングは観察を行う度に行う必要はなく、例えば故障等によりスキャナ4自体を交換したり走査ステージ13を交換したりしたときに行えばよい。

【0056】なお、レボルバを用いる場合、予め対物レンズ5毎に移動位置情報を取得してメモリ14に記憶し、対物レンズ5を切替える毎に対応する移動位置情報

を読み出すようにしてもよい。

【0057】また、4枚以上の部分画像をつなぎ合わせる場合でも、上記と同様な操作を行うことで1回の走査で得られた全体画像に匹敵する1枚の画像を得ることができる。

【0058】同様にして、走査ステージ13の移動可能な視野範囲全体の1枚の画像を得ることもできる。このとき、画像を一度にモニタ11に表示させるには部分画像に対応して多くのフレームメモリ10（又はハードディスク）を必要とするが、スクロール機能を用いれば大きな視野範囲を1枚の画像として観察することができる。

【0059】図4は画像取得範囲の変形例を示す図である。

【0060】例えば、試料20が図の一点鎖線で示す形状の場合、画像取得範囲を図4（a）又は図4（b）とすることができる。

【0061】このようにすることで、画像取得しない範囲A1、A2に対応する部分のフレームメモリ10を節約することができる。

【0062】図5（a）は他のキャリブレーションチャートを形成したスライドガラスの平面図であり、図5（b）はチャートパターンが連続でない場合を説明するモニタ画面を示す図、図5（c）はチャートパターンが連続である場合を説明するモニタ画面を示す図である。

【0063】この同心円状のチャートパターンが形成されたキャリブレーションチャート115Aを用いた場合も、図3（a）のキャリブレーションチャート15Aを用いた場合と同様に、4枚の部分画像をつなぎ合わせて1回の走査で得られた画像に匹敵する1枚の画像を得ることができる。

【0064】図6は1つの対物レンズによる接眼視野内に収まる部分画像をつなぎ合わせて画像を作成する場合のパラメータの例を示す図、図7（a）は精細モードにおける画像取得を説明する図、図7（b）は節約モードにおける画像取得を説明する図である。

【0065】1つの対物レンズ5による接眼視野内に収まる部分画像をつなぎ合わせて画像を作成する場合には、まず図1に示すレーザ走査顕微鏡の有するズーム機能によりモニタ11画面上に観察したい試料20の全領域の画像を取得する。

【0066】対物レンズ5の倍率と、対物レンズ5の開口径数と、照明光（レーザ光）の波長とをパラメータとしたとき（図6参照）、ナイキストのサンプリング定理から画素の間隔 ΔX 、 ΔY が決まるとともに、求める画像領域に必要な画素数も決まる。

【0067】画像領域の画素数 X 、 Y がフレームメモリ10（例えば、画素数 512×512 ）の整数倍となっていれば、 $(X/512) \times (Y/512)$ 枚の部分画像を取得し、つなぎ合わせることで画像を得ることが

きる。

【0068】なお、観察者の好みにより、図7（a）に示すように部分画像をより細かくして試料20の画像を取得しても、図7（b）に示すように部分画像を大きくして試料20の画像を取得してもよい。

【0069】後者によれば、フレームメモリ10を節約したい場合や画像取得時間を短くできる。

【0070】図8は高倍率・高開口数の対物レンズでは接眼視野に収まらない大きい領域の画像を高分解能で取得する場合の説明図である。

【0071】実際に画像取得に用いたい高倍率・高開口数の対物レンズ5（例えば、倍率：40×）では接眼視野に収まらない大きい領域の画像を高分解能で取得したい場合には、まず観察したい領域が1つの領域に収まるような低倍の対物レンズ5（例えば、倍率：10×）を用いてモニタ11の画面上に観察したい全領域の画像11Aを取得する。

【0072】その後、図8に矢印aで示すように高倍率・高開口数の対物レンズ5で取得した領域11Bの始点p1を倍率差分に応じて始点p0へ移動した後、上記方法と同様にして部分画像の取得及び画像のつなぎ合わせを行う。

【0073】上記始点は手入力で、又は数種の対物レンズ5を装着したレボルバであって対物レンズ5の自動認識機能あるいは自動指定機能を備えている場合には自動的に移動される。

【0074】なお、上記実施形態はレーザ走査顕微鏡装置を用いた場合で説明したが、一般の走査顕微鏡を用いることもできる。また、反射型の顕微鏡に限るものではなく、透過型の顕微鏡にも適用できる。更に、光学顕微鏡にも適用できる。

【0075】

【発明の効果】以上に説明したように請求項1～6に記載の発明の顕微鏡装置及び画像作成方法によれば、広視野の画像を、各部分画像と同等の光学分解能を維持したまま取得することができるので、例えば離れた細胞間の反応を1つの画面内で見ることができ、離れた細胞間の相互作用等を容易に観察することができる。また、容量が大きいが高価である容量の大きなフレームメモリを用いなくてよいので、顕微鏡装置のコストダウンを図ることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1はこの発明の一実施形態に係る顕微鏡装置の概念図である。

【図2】図2は画像作成方法を説明する図である。

【図3】図3（a）はキャリブレーションチャートが形成されたスライドガラスの平面図であり、図3（b）はチャートパターンが連続でない場合を説明するモニタ画面を示す図、図3（c）はチャートパターンが連続である場合を説明するモニタ画面を示す図である。

【図4】図4は画像取得範囲の変形例を示す図である。

【図5】図5 (a) は他のキャリブレーションチャートを形成したスライドガラスの平面図であり、図5 (b) はチャートパターンが連続でない場合を説明するモニタ画面を示す図、図5 (c) はチャートパターンが連続である場合を説明するモニタ画面を示す図である。

【図6】図6は1つの対物レンズによる接眼視野内に収まる部分画像をつなぎ合わせて合成画像を作成する場合のパラメータの例を示す図である。

【図7】図7 (a) は精細モードにおける画像取得を説明する図、図7 (b) は節約モードにおける画像取得を説明する図である。

【図8】図8は高倍率・高開口数の対物レンズでは接眼視野に収まらない大きい領域の画像を高分解能で取得す

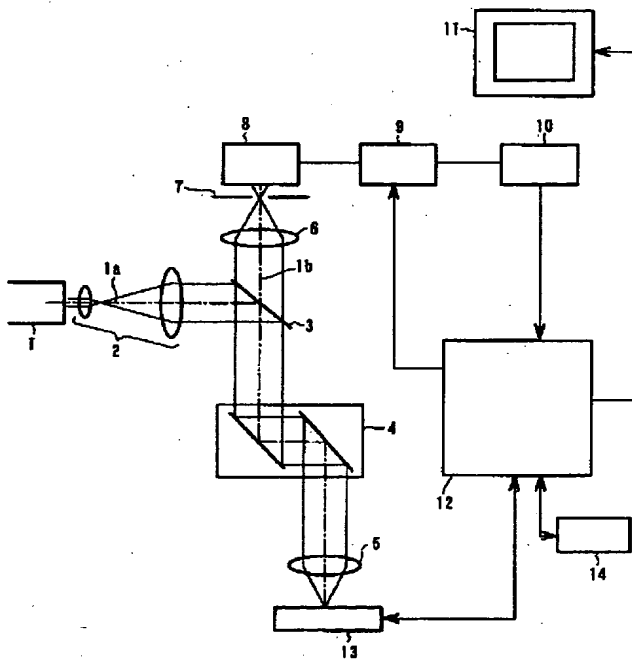
る場合の説明図である。

【図9】図9 (a) は対物レンズによって可能な光学分解能を損なわない視野の場合の説明図、図9 (b) は観察したい視野が予め決まっている場合の説明図、図9 (c) は画素数の大きなフレームメモリを用いた場合の説明図である。

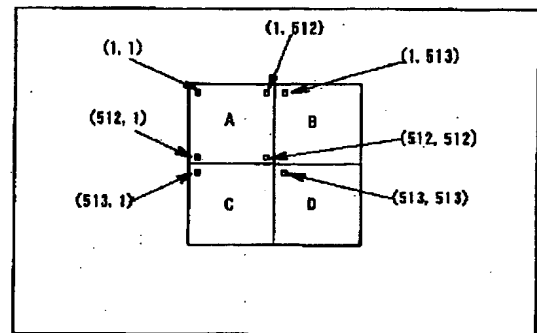
【符号の説明】

- 10 フレームメモリ (画像取得手段)
- 12 CPU (画像合成手段)
- 13 走査ステージ (ステージ)
- 14 メモリ (記憶手段)
- 15 A, 115 A キャリブレーションチャート
- A, B, C, D 部分画像

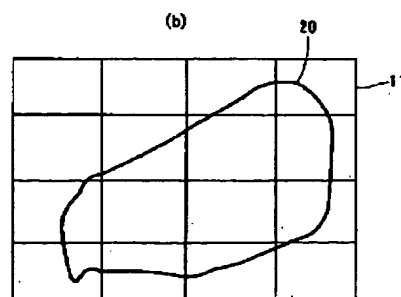
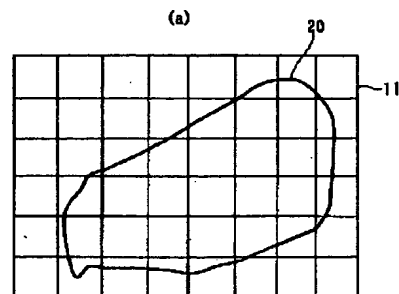
【図1】



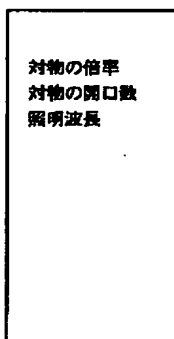
【図2】



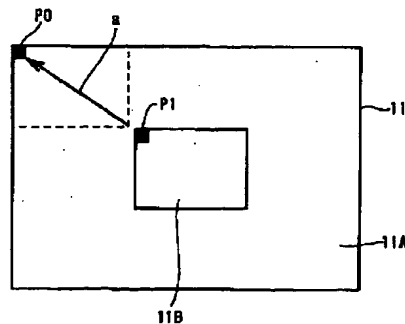
【図7】



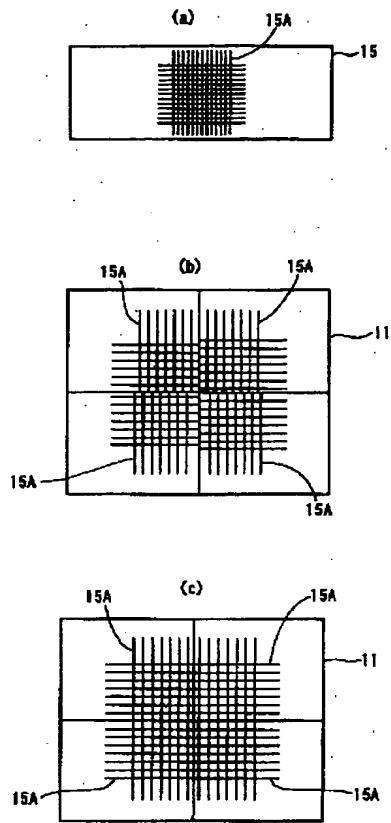
【図6】



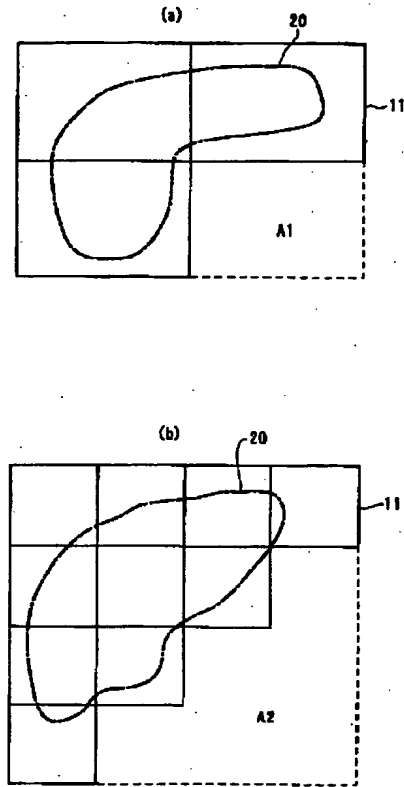
【図8】



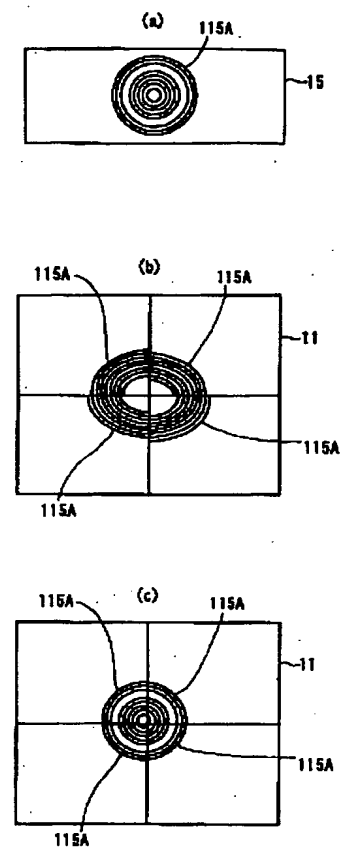
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【図9】

